

CD 14 JAN 2000

09/73/14835
PCT/JP99/03824

日 本 国 特 許 庁
PCT
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

22.11.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 7月22日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第206057号

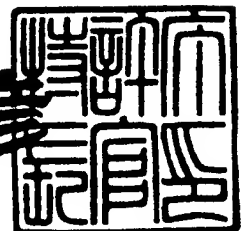
出 願 人
Applicant (s):

工業技術院長
プレシジョン・システム・サイエンス株式会社
町田 雅之

1999年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



【書類名】 特許願

【整理番号】 1066

【提出日】 平成10年 7月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
C12M 1/34

【発明の名称】 標識化複合粒子並びにその製造方法及び使用方法

【請求項の数】 29

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学
工業技術研究所内

【氏名】 町田 雅之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都稲城市矢野口1843番地1 プレシジョン・シ
ステム・サイエンス株式会社内

【氏名】 田島 秀二

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【特許出願人】

【識別番号】 591081697

【住所又は居所】 東京都稲城市矢野口1843番地1

【氏名又は名称】 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社

【特許出願人】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工
学工業技術研究所内

【氏名又は名称】 町田 雅之

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3

【氏名又は名称】 工業技術院生命工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【代理人】

【識別番号】 100075199

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番3号 第12森ビル

【弁理士】

【氏名又は名称】 土橋 皓

【電話番号】 03-3580-8931

【代理関係の特記事項】 特許出願人 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社、及び、特許出願人 町田雅之の代理人

【復代理人】

【識別番号】 100075199

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番3号 第12森ビル

【弁理士】

【氏名又は名称】 土橋 皓

【電話番号】 03-3580-8931

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の復代理人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019792

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9714832

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標識化複合粒子並びにその製造方法及び使用方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 1 個の微小粒子と、該微小粒子に一端が結合した多数の標的保有体と、各標的保有体の他端に結合した標識物質とからなり、該標的保有体は、1 又は 2 以上の種類の標的を保有し又は保有可能であり、該標識物質は、所定の種類が所定の量比含まれたものであることを特徴とする標識化複合粒子。

【請求項 2】 前記標識物質は、1 個の微小粒子と結合する全標的保有体に分配され、1 個の標的保有体は 1 種類の標識物質と結合したものであることを特徴とする請求項 1 記載の標識化複合粒子。

【請求項 3】 前記標的保有体は、一端で前記微小粒子と結合し、他端で前記標識物質と結合した線状、糸状、毛状、又は棒状等の長細形状に形成されたものであることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 記載の標識化複合粒子。

【請求項 4】 前記標的保有体は、核酸、ペプチド、蛋白質若しくは脂質等の生体化合物を含む化合物、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生物体若しくはその一部、又は、これらを保持し、若しくは保持可能な物質からなることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 に記載の標識化複合粒子。

【請求項 5】 前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記標識物質は、一本鎖の一端にのみ結合し、他の一本鎖の他端が前記微小粒子と結合したものであることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 4 記載の標識化複合粒子。

【請求項 6】 前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記標識物質は、一本鎖の一端にのみ結合し、該一本鎖の他端に前記微小粒子が固定したものであることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 4 記載の標識化複合粒子。

【請求項 7】 前記標的保有体の核酸は一本鎖であることを特徴とする請求項 6 記載の標識化複合粒子。

【請求項 8】 前記標識物質は、蛍光物質又は燐光物質等のルミネッセンスによる発光物質であることを特徴とする請求項 1 乃至 6 記載の標識化複合粒子。

【請求項 9】 前記発光物質は、励起波長、発光波長、発光強度、発光偏光度、発光位相又は発光寿命のいずれかによって、その種類が識別可能であることを特徴とする請求項 8 記載の標識化複合粒子。

【請求項 10】 前記微小粒子には、アビジン及びビオチン等の特異的に結合する化合物対の一方の化合物がコーティングされ、前記標的保有体は所定塩基配列をもつ DNA 断片であり、その一端には前記化合物対の他方の化合物が結合し、他端には前記蛍光物質が結合したものであることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 4 記載の標識化複合粒子。

【請求項 11】 前記微小粒子は、遠隔操作可能な磁性体粒子等の遠隔作用体で形成したことを特徴とする請求項 1 乃至請求項 10 に記載の標識化複合粒子。

【請求項 12】 請求項 1 乃至請求項 11 に係る標識化複合粒子を製造する方法において、他端で標識物質と結合し、特定の標的を保有又は保有可能な標的保有体を生成する工程と、該標的保有体を微小粒子に結合する工程とを有することを特徴とする標識化複合粒子製造方法。

【請求項 13】 前記微小粒子に標的保有体を結合する工程は、該標的保有体を、その一端で結合した標識物質が該標的保有体の種類又はその種類及び個数比に応じて定められた種類及び量比となるように多数懸濁させた液体中に、該標的保有体が結合されるべき微小粒子を混合することによって行うことを特徴とする請求項 12 記載の標識化複合粒子製造方法。

【請求項 14】 前記標的保有体を生成する工程は、標識物質と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸を合成し、該塩基配列と関連性の高い、前記微小粒子と結合可能に加工された他の一本鎖の核酸を合成し、これらをアニーリングによって二本鎖の核酸を生成する工程を有することを特徴とする請求項 12 記載の標識化複合粒子製造方法。

【請求項 15】 前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸の複製用の第 1 のプライマと、前記微小粒子と結合すべき他の一本鎖の核酸の複製用の第 2 のプライマとを用いて、二本鎖の該核酸を合成し及び増幅する工程を有することを特徴とする請求項 12 記載の標

識化複合粒子製造方法。

【請求項16】 前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質又は前記微小粒子のどちらか一方と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸の複製用の第1のプライマを用いて、二本鎖の該核酸を合成及び増幅するとともに、前記標識物質又は微小粒子が結合している端部と反対側の端部に制限酵素処理を施し、制限酵素処理が施された端部にDNAリガーゼ等からなるアダプタを介して微小粒子又は標識物質を、前記標識物質又は微小粒子が結合している一本鎖側に結合して、標的保有体を生成することを特徴とする請求項12記載の標識化複合粒子製造方法。

【請求項17】 前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質及び前記微小粒子と結合していない方の一本鎖を変性によって除去する工程を含むことを特徴とする請求項16記載の標識化複合粒子製造方法。

【請求項18】 前記微小粒子に標的保有体を結合する工程は、微小粒子が有する多数の穴、間隙若しくは凹凸による付着、吸着、接着、ビオチンとアビジン等の特異的相互作用等の物理的若しくは化学的結合を含む結合を利用して、前記標的保有体と微小粒子とを懸濁することによって、前記標的保有体と微小粒子とを結合することを特徴とする請求項12記載の標識化複合粒子製造方法。

【請求項19】 前記標的保有体を生成する工程は、その一端で該標識物質に結合し、その他端で特異的に結合する化合物対の一方が結合した複数個の標的保有体を生成する工程であり、該標的保有体を微小粒子に結合する工程は、前記化合物対の他方がコーティングされた微小粒子と、該標識物質が結合した前記標的保有体とを液体中で懸濁することによって、該標的保有体を微小粒子に結合することを特徴とする請求項12記載の標識化複合粒子製造方法。

【請求項20】 請求項1乃至請求項11に係る標識化複合粒子の標的及び該標的に対応付けられた標識物質の種類若しくは量比が相互に異なる複数種類の標識化複合粒子を多数有する標識化複合粒子群の中から、目的とする種類の標識化複合粒子を選別する工程と、選別された該標識化複合粒子が標識化した標的を識別する工程とを有することを特徴とする標識化複合粒子使用方法。

【請求項21】 前記選別工程は、先端部と、貯溜部と、先端部と貯溜部と

を結ぶ液通路内に磁場作用を及ぼすことが可能な磁力手段とを有し、液体の吸引又は吐出を行うピペット手段を用いて、前記標識化複合粒子に対して、又は該標識化複合粒子及び選別用物質に対して、定量、分離、分取、分注、清澄、懸濁、攪拌、濃縮、希釈、混合、接触、捕獲、保持、洗浄、変性、インキュベーション、温度制御、抽出、回収又は移送等の作業により又はこれらの作業の組み合わせによって、行われることを特徴とする請求項 20 記載の標識化複合粒子使用方法。

【請求項 22】 前記選別工程は、前記標識化複合粒子群を懸濁する工程と、該標識化複合粒子群が懸濁した懸濁液と、目的とする標識化複合粒子を選別するための選別用物質とを接触させる工程と、該選別用物質と結合した標識化複合粒子を抽出又は分離する工程とを有することを特徴とする請求項 20 又は請求項 21 に記載の標識化複合粒子使用方法。

【請求項 23】 前記選別工程は、前記選別用物質を、標識化複合粒子に含有される標識物質とは異なる種類の標識物質により標識化するとともに、該標識物質に基づいて、該選別用物質と結合した標識化複合粒子を抽出又は分離する工程を有することを特徴とする請求項 22 記載の標識化複合粒子使用方法。

【請求項 24】 前記識別工程は、前記標識物質が発光物質である場合には、該標識化複合粒子が発する発光波長の各強度の測定結果に基づいて、該種類の量比を割出して、該当する標的を識別することを特徴とする請求項 20 又は請求項 21 に記載の標識化複合粒子使用方法。

【請求項 25】 前記選別工程は、前記標的保有体が二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸であって、前記標識物質及び前記微小粒子はその片側の一本鎖にのみ結合している場合には、他方の一本鎖は変性によって除去するとともに、前記選別用物質として、所定塩基配列をもつ核酸を用いたことを特徴とする請求項 20 又は請求項 21 に記載の標識化複合粒子使用方法。

【請求項 26】 前記選別工程は、選別用物質が固定された固定相と前記標識化複合粒子群が懸濁した液とを接触させる工程と、洗浄して懸濁液を除去することによって、固定相に該選別用物質と結合した標識化複合粒子を選別する工程とを有することを特徴とする請求項 20 又は請求項 21 に記載の標識化複合粒子

使用方法。

【請求項27】 前記選別工程は、前記固定相から物理的又は化学的に標識化複合粒子を溶出して抽出、分離、又は洗浄等によって選別する工程を有することを特徴とする請求項26記載の標識化複合粒子使用方法。

【請求項28】 前記固定相として磁性体粒子を用い、前記標識化複合粒子の微小粒子は磁性体粒子又は非磁性体粒子で形成されるとともに、該標識化複合粒子の磁性体粒子は、固定相の磁性体粒子と比較して、同一の外部磁場に対してより小さい磁力を受けることを特徴とする請求項26記載の標識化複合粒子使用方法。

【請求項29】 前記選別用物質は、特異的な結合をする化合物対の一方の標識物質で標識化されるとともに、前記選別工程において、前記化合物対の他方を固定化した固定相に該選別用物質及び標識化複合粒子の複合体を懸濁した液を接触させて、前記固定相に該複合体を結合させ、該固定相に結合した物以外の物を洗浄して除去し、前記標的保有体を変性して一本鎖にして標識化複合粒子を溶出して抽出又は分離によって選別する工程を有することを特徴とする請求項26記載の標識化複合粒子使用方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標識化複合粒子並びにその製造方法及び使用方法に関する。単位体積当たりの表面積が大きい微小粒子は、生物学的分子を取り着けるための優れた固体を提供するとともに、これらの微小粒子を蛍光等の発光物質で標識化することは、高い感度でのそれらの検出を可能にする。本発明は、農学、薬学、医学、化学又は生物学等の理学、工学の分野で、遺伝子操作や医療、薬品、生理衛生、保健、生物、食品又は材料等の種々の領域で、検査、測定、反応、生産、抽出又は観察等を行うために用いるものである。

【0002】

【従来の技術】

従来から、微小物質を標識化して、高い感度で識別するために、蛍光等の発光

物質が用いられている。例えば、試料中の核酸を測定するため、蛍光性微小粒子を結合したDNAプローブと、異なるDNAプローブと結合した粒径の大きい非蛍光性微小粒子とを用いて、試料中のDNAプローブとハイブリダイズして、二本鎖を形成させる。その後、2種類の微小粒子の粒径の中間径のフィルタで、未結合の余剰蛍光粒子を除去し、制限酵素を作用させて、2本鎖部位を切断し、遊離した蛍光性微小粒子をフィルタで分別し、フローセルに導入して蛍光によって粒子を識別し粒子数を計数することによって、試料中のDNAプローブの濃度の測定の自動化を行うものがあった（特開平6-343496）。

【0003】

又は、被検物質中の特異性のある部分Aに結合する物質を結合させた蛍光波長Xの蛍光微粒子Pと、被検物質中の上記部分Aとは異なる、特異性のある部分Bに結合する物質を結合させた蛍光波長Yの蛍光微粒子Qとを用いて、被検物質中に蛍光微粒子P、Qの両者を特異的に結合させて、得られた混合液をフローサイトメータに一定量流し、上記溶液中の蛍光微粒子P、Qの発する前方散乱光、上記蛍光波長X、Yをそれぞれ含む2種類の蛍光を測定することによって、リガンドとの反応によるラテックス凝集を識別して粒子計測装置で測定するものがあった（特開平5-107249）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

ところで、以上説明したように、従来では、各粒子にはせいぜい1種類の蛍光物質が付着させるか、又は、蛍光物質そのものを微小粒子に形成し、該粒子に結合物質を付着させて用いるものであった。一方、DNA等の生体化合物に悪影響を与えずに、且つ高感度で識別可能な蛍光物質の種類は限られ、せいぜい数十種類である。そのため、従来のやり方では、せいぜい数十通りの識別を実現することしかできず、例えば、数千、又は数万の種類の目的物を蛍光物質だけで識別することはできなかった。

【0005】

一方、多数の種類の目的物を複数種類の蛍光物質によって、識別可能とするために、これらの蛍光物質を組み合わせる微小粒子に付着させて抗原および／また

は抗体を検出するものがあつた（特開昭60-35265）。しかし、微小粒子表面のような狭い領域に、多数の蛍光物質を高密度に付着することは、蛍光物質間のエネルギー遷移やクエンチングが発生して、スペクトルの識別及び蛍光強度に悪影響を与える。そのため、安定した状態で、何千又は何万以上の目的物の種類を、蛍光物質で微小粒子を標識化して識別するのは不可能であるという問題点を有していた。また、微小粒子表面への蛍光物質の付着量を増加させて、発光強度や識別数を増加させることと、微小粒子表面へ目的物質を捕獲させる能力を増加させたり、微小粒子表面が保有する情報量を増加させるために情報を保有するための領域面積を増加させることとは相矛盾し、その双方の能力を満足させることができないという問題点を有していた。

【0006】

そこで、本発明は、第一には、コンビナトリアル・ケミストリにおける多分子マーキングとして、数百、数千、数万のオーダー以上の種々の微小物を高感度、高精度、安定的、且つ明瞭に峻別することを可能とする標識化複合粒子並びにその製造及び使用方法を提供するものである。

【0007】

第二には、物質の捕獲能力や情報保持能力の向上と、識別感度や識別数等の識別能力の向上との全てを同時に満足することができる優れた標識化複合粒子並びにその製造及び使用方法を提供するものである。

【0008】

第三には、微小粒子を用いることで、単位体積又は単位質量当たり多くの情報量を標識化することによって、多数の標識化した容器の使用を省略することができるので、省空間、装置規模の縮小を図るとともに、一斉に同一の条件で処理を加えることによって、精度が高く、効率的且つ迅速な処理を行うことができる標識化複合粒子並びにその製造及び使用方法を提供するものである。

【0009】

第四には、磁性体粒子を標識化することによって、種々の多様な処理の自動化を分注から測定まで一貫して実現することができることによって、磁性体粒子の機能を飛躍的に増大することができる標識化複合粒子並びにその製造及び使用方

法を提供するものである。

【0010】

第五には、安価に、容易に、且つ安定した品質で製造することができるとともに、識別又は測定が容易、高精度、且つ信頼性が高い標識化複合粒子並びにその製造及び使用方法を提供するものである。

【0011】

第六には、汎用性又は多様性のある使用をすることができる標識化複合粒子並びにその製造及び使用方法を提供するものである。

第七には、種々の蛋白質等の物質と、種々の塩基配列に対して転写の制御を行うことができる転写制御因子及び異なる塩基配列を有するDNA断片等の対応物質との間の関連性を見極めるためにきめ細かい標識化を可能にし、ガンや生物の発生等の研究、医薬や化学品製造や遺伝子技術等への多大の寄与をすることができる標識化複合粒子並びにその製造及び使用方法を提供するものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

以上の技術的課題を解決するために、第一の発明は、1個の微小粒子と、該微小粒子に一端が結合した多数の標的保有体と、各標的保有体の他端に結合した標識物質とからなり、該標的保有体は、1又は2以上の種類の標的を保有し又は保有可能であり、該標識物質は、所定の種類が所定の量比含まれたものである。

【0013】

ここで、「微小粒子」は、形状に特に限定はないが、例えば、球状である。該粒径の大きさは特に限定されるものではないが、好ましくは、約0.1 μm ～約1 μm のオーダーをもつものである。該微小粒子は、例えば、トリスチレン、ナイロン等の合成樹脂のビーズ、ラテックス粒子、ガラスビーズ、ゲル状物質、又は磁性体粒子等の金属粒子で形成されるのが好ましい。

【0014】

「標識物質」には、蛍光や燐光等の励起光を必要とする発光物質に限られず、励起光を必要としない化学発光、生物発光であっても良い。その他に、例えば、特定の物質と特異的に反応する物質や、放射性同位元素等の放射性物質、赤外線

等の電磁波放射物質等であっても良い。また、これらを組み合わせて用いることも可能である。

【0015】

標識物質及び標的保有体を別個に各々微小粒子に結合させずに、標識物質が結合した標的保有体を微小粒子に結合するのは次の理由からである。

- (1) 数千又は数万以上の種類を識別するために「種類」及び「量比」を変えた大量の標識物質を限られた微小粒子の表面に直接結合させることは、検査用物質や標的を結合又は保有するための領域を狭め保有又は捕獲能力を劣化させる。しかし、標的保有体自体に標識物質を結合させれば、標的や検査用物質の保有捕獲能力と識別能力の双方の能力の向上を図ることができる。
- (2) 標的保有体に標識物質を結合させることによって、標識物質を微小粒子に直接取り付ける場合に比較して、標識物質間の間隔、距離を広げ、標識物質間のエネルギー遷移やクエンチングの発生を防止し、大量の標識物質を微小粒子にもたせても安定した発光等による識別の可能性をより確実に保証することができる。
- (3) 微小粒子に担持させているので、液体中での懸濁や分布を一様且つ均一に行うことができるので、統計上の誤差を小さくして信頼性及び精度の高い処理を行うことができる。

【0016】

標的保有体を微小物質に固定するには、例えば、微小粒子が有する多数の穴、間隙若しくは凹凸による付着、吸着、接着、ビオチンとアビジン等の特異的相互作用等の物理的若しくは化学的結合等を含む結合を利用して行われる。

【0017】

「標的」は、例えば、遺伝情報、免疫情報等の生物情報や化合物の構造等の情報そのもの、又は、該情報を有するDNA等、アミノ酸、糖等の生体化合物を含む化合物や、細胞、ウィルス、細菌糖の生物体や生物体の一部や、その他の種々の物質があり得る。また、「標的を保有し」とは、標的保有体が標的自体又は標的を含有し又は標的保有体が標的を吸着、反応、相互作用等によって保持する場合も含む。

【0018】

「1又は2以上の種類の標的」であるので、例えば、1粒子につき複数種類の標的群毎に標識化することができるので、該標的群毎の共通の性質等を検査測定することができる。また、「一端」及び「他端」にはその近傍も含む。

【0019】

第二の発明は、第一の発明において、前記標識物質は、1個の微小粒子と結合する全標的保有体に分配され、1個の標的保有体は1種類の標識物質と結合したものである。

【0020】

第三の発明は、第一の発明又は第二の発明において、前記標的保有体は、一端で前記微小粒子に固定され、他端で前記標識物質と結合した線状、糸状、毛状、又は棒状等の長細形状に形成されたものである。

【0021】

「長細形状」のサイズには、特に限定はないが、例えば、前記微小粒子の粒径に比較して、該粒径よりも太さは十分に細く、長さが該太さよりも長く、例えば、該粒径と同程度またはそれ以上に十分に長い形状であり、例えば、粒径の約10倍程度、例えば、約10 μm である。

【0022】

長細形状に形成するのは、その端に発光物質等の標識物質を取り付けることによって、標識物質を微小粒子に直接取り付ける場合に比較して、微小粒子との間隔、さらには標識物質間の間隔、距離を広げ標識物質間のエネルギー遷移やクエンチングの発生を防止し、大量の標識物質を微小粒子にもたせても安定した発光等の識別の可能性をより確実に保証するスペーサとしての役割を担わせるためである。

【0023】

第四の発明は、第一の発明乃至第三の発明において、前記標的保有体は、例えば、核酸、ペプチド、蛋白質若しくは脂質等の生体化合物を含む化合物、又は、プラスミド、ウィルス若しくは細菌等の生物体若しくはその一部、又は、これらを保持し若しくは保持可能な物質である。

【0024】

ここで、「核酸」は、狭義には、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）であり、広義には、PNAを含めても良い。RNAには、mRNA、tRNA、rRNAがある。また、DNA、RNA全体のみならず、そのDNA、RNAの断片である場合も含む。

【0025】

第五の発明は、第一の発明乃至第四の発明において、前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記標識物質は、一本鎖の一端にのみ結合し、他の一本鎖の他端が前記微小粒子と結合したものである。

【0026】

尚、例えば、標識物質として蛍光物質を用いた場合には、DNA又はRNAに蛍光物質を結合させる方法としては、例えば、チオカルバミド結合等の共有結合によるものがある。

【0027】

第六の発明は、第一の発明乃至第四の発明において、前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記標識物質は、一本鎖の一端にのみ結合し、該一本鎖の他端に前記微小粒子が結合したものである。

【0028】

第七の発明は、第六の発明において、前記標的保有体の核酸は一本鎖である。ここで、一本鎖を得るには、例えば、熱処理や、アルカリ性溶液等を加える変性によって行うことができる。

【0029】

第八の発明は、第一の発明乃至第六の発明において、前記標識物質は、蛍光物質又は燐光物質等のルミネッセンスによる発光物質である。

ここで、蛍光物質は、例えば、FITC（フルオレッセイン イソチオシアネート）、ローダミン、イソチオシアネート、IRD40、CY3若しくはCY5等の有機物質又はユウロピウム錯体等の長寿命の蛍光を発する無機物質がある。

【0030】

第九の発明は、第八の発明において、前記発光物質は、励起波長、発光波長、発光強度、発光偏光度、発光位相又は発光寿命のいずれかによって、その種類識

別可能である。ここで、「発光偏光度」とは、偏光した励起光で蛍光分子を励起することにより、発生した蛍光がどの程度偏光しているかを測定する方法である。

【0031】

第十の発明は、第一の発明乃至第四の発明において、前記微小粒子には、アビジン及びビオチン等の特異的に結合する化合物対の一方の化合物がコーティングされ、前記標的保有体は所定塩基配列をもつDNA断片であり、その一端には前記化合物対の他方の化合物が結合し、他端には前記蛍光物質が結合したものである。ここで、「特異的に結合する化合物対」には、アビジン及びビオチンの対の他FITC及びアンチFITC抗体の対等のような抗原及び抗体の対がある。

【0032】

第十一の発明は、第一の発明乃至第十の発明において、前記微小粒子は、遠隔操作可能な磁性体粒子等の遠隔作用体で形成したものである。ここで、遠隔作用体には、磁性体粒子、荷電粒子、誘電体、走性微生物等がある。磁性体粒子を用いた場合には、例えば、磁力体を組み込んだピペット手段によって作業を自動化することができる。荷電粒子を微小粒子に用いた場合には、標識物質に同じ電荷をもつようにすれば、互いに反発しあって、標識物質を互いに離間させることができる。

【0033】

第十二の発明は、第一の発明乃至第十一の発明に係る標識化複合粒子を製造する方法において、他端で標識物質と結合し、特定の標的を保有又は保有可能な標的保有体を生成する工程と、該標的保有体を微小粒子に結合する工程とを有するものである。

【0034】

第十三の発明は、第十二の発明において、前記微小粒子に標的保有体を結合する工程は、該標的保有体を、その一端で結合した標識物質が該標的保有体の種類又はその種類及び個数比に応じて予め定めた種類及び量比となるように多数懸濁させた液体中に、該標的保有体が結合されるべき微小粒子を混合することによって行うものである。

【0035】

本発明によれば、標識物質特定した種類が特定した量比をもつように結合した標的保有体を多数懸濁させた液体中に微小粒子を混合させるようにしている。微小粒子は多数の該標的保有体の中からランダムに選択した標的保有体の一部と接触し且つ結合することになる。従って、微小粒子と接触且つ結合した標的保有体のもつ標識物質の種類及び量比は、懸濁させた標的保有体全体がもつ該標識物質の種類及び量比を統計誤差内で反映する。

【0036】

ここで、「量比」は、該統計誤差を越えるような大きさの明確なオーダーの比をもつように定める必要がある。また、「懸濁」は標的保有体が十分に均質になるように攪拌するのが好ましい。

【0037】

第十四の発明は、第十二の発明において、前記標的保有体を生成する工程は、標識物質と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸を合成し、該塩基配列と関連性の高い、前記微小粒子と結合可能に加工された他の一本鎖の核酸を合成し、これらをアニーリングによって二本鎖の核酸を生成する工程を有するものである。ここで、「関連性が高い」には、相補性又は相同性の高い場合を、相互作用が強い（親和性が高い）場合を含む。

【0038】

第十五の発明は、第十二の発明において、前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸の複製用の第1のプライマと、前記微小粒子と結合すべき他の一本鎖の核酸の複製用の第2のプライマとを用いて、二本鎖の該核酸を合成し及び増幅する工程を有するものである。

【0039】

第十六の発明は、第十二の発明において、前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質又は前記微小粒子のどちらか一方と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸の複製用の第1のプライマを用いて、二本鎖の該核酸を合成及び増幅するとともに、前記標識物質又は微小粒子が結合している端部と反対側の端部に制限酵素処理を施し、制限酵素処理が施された端部にDNAリガーゼ等からなる

アダプタを介して微小粒子又は標識物質を、前記標識物質又は微小粒子が結合している一本鎖側に結合して、標的保有体を生成するものである。

【0040】

第十七の発明は、第十六の発明において、前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質及び前記微小粒子と結合していない方の一本鎖を変性によって除去する工程を含むものである。

【0041】

第十八の発明は、第十二の発明において、前記微小粒子に標的保有体を結合する工程は、微小粒子が有する多数の穴、間隙若しくは凹凸による付着、吸着、接着、ビオチンとアビジン等の特異的相互作用等の物理的又は化学的結合を含む結合を利用して、前記標的保有体と微小粒子とを懸濁することによって、前記標的保有体と微小粒子とを結合するものである。

【0042】

第十九の発明は、第十二の発明において、前記標的保有体を生成する工程は、その一端で標識物質に結合し、その他端で特異的に結合する化合物対の一方が結合した複数個の標的保有体を生成する工程であり、該標的保有体を微小粒子に結合する工程は、前記化合物対の他方がコーティングされた微小粒子と、該標識物質が結合した前記標的保有体とを液体中で懸濁することによって、該標的保有体を微小粒子に結合する工程である。

【0043】

第二十の発明は、第一の発明乃至第十一の発明に係る標識化複合粒子の標的及び該標的に対応付けられた標識物質の種類若しくは量比が相互に異なる複数種類の標識化複合粒子を多数有する標識化複合粒子群の中から、目的とする種類の標識化複合粒子を選別する工程と、選別された該標識化複合粒子が標識化した標的を識別する工程とを有するものである。

【0044】

第二十一の発明は、第二十の発明において、前記選別工程は、先端部と、貯溜部と、先端部と貯溜部とを結ぶ液通路内に磁場作用を及ぼすことが可能な磁力手段とを有し、液体の吸引又は吐出を行うピペット手段を用いて、前記標識化複合

粒子に対して、又は該標識化複合粒子及び選別用物質に対して、定量、分離、分取、分注、清澄、懸濁、攪拌、濃縮、希釈、混合、接触、保持、捕獲、洗浄、変性、インキュベーション、温度制御、抽出、回収又は移送等の作業により又はこれらの作業の組み合わせによって、処理が行われるものである。

ここで、前記ピペット手段は、単一のもののみならず、複数の先端部、液通路、貯溜部及び磁力手段を集積化した装置であっても良い。

【0045】

第二十二の発明は、第二十の発明又は第二十一の発明において、前記選別工程は、前記標識化複合粒子群を懸濁する工程と、該標識化複合粒子群が懸濁した懸濁液と、目的とする標識化複合粒子を選別するための選別用物質とを接触させる工程と、該選別用物質と結合した標識化複合粒子を抽出又は分離する工程とを有するものである。ここで、「接触」は、例えば、両者を混合することによって、又は、一方が固定された容器へ他方を注入すること等によって行う。

【0046】

第二十三の発明は、第二十二の発明において、前記選別工程は、前記選別用物質を、標識化複合粒子に含有される標識物質とは異なる種類の標識物質により標識化するとともに、該標識物質に基づいて、該選別用物質と結合した標識化複合粒子を抽出又は分離する工程とを有するものである。

【0047】

第二十四の発明は、第二十の発明又は第二十一の発明において、前記識別工程は、前記標識物質が発光物質である場合には、該標識化複合粒子が発する発光波長の各強度の測定結果に基づいて、該種類の量比を割出して、該当する標的を識別するものである。

【0048】

第二十五の発明は、第二十の発明又は第二十一の発明において、前記選別工程は、前記標的保有体が二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸であって、前記標識物質及び前記微小粒子はその片側の一本鎖にのみ結合している場合には、他方の一本鎖は変性によって除去するとともに、前記選別用物質として、所定塩基配列をもつ核酸を用いたものである。

【0049】

これによって、選別用物質の検査用塩基配列と相補性又は相同性が高い構造をもつ標的保有体にハイブリダイズする。該標識物質を捕獲した標識化複合粒子を識別することによって、該標的の構造がわかる。

【0050】

第二十六の発明は、第二十の発明又は第二十一の発明において、前記選別工程は、選別用物質が固定された固定相と前記標識化複合粒子群が懸濁した液とを接触させる工程と、洗浄して懸濁液を除去することによって、固定相に該選別用物質と結合した標識化複合粒子を選別する工程とを有するものである。

【0051】

第二十七の発明は、第二十六の発明において、前記選別工程は、前記固定相から物理的又は化学的に標識化複合粒子を溶出して抽出、分離又は洗浄等によって選別する工程を有するものである。ここで、「物理的な溶出」には、振動、衝撃、圧力、熱等を与える場合があり、「化学的な溶出」には、溶液等を加える場合がある。

【0052】

第二十八の発明は、第二十六の発明において、前記固定相として磁性体粒子を用い、前記標識化複合粒子の微小粒子は磁性体粒子又は非磁性体粒子で形成されるとともに、該標識化複合粒子の磁性体粒子は、固定相の磁性体粒子と比較して、同一の外部磁場に対してより小さい磁力を受けるものである。

【0053】

第二十九の発明は、第二十六の発明において、前記選別用物質は、特異的な結合をする化合物対の一方を標識物質として標識化されるとともに、前記選別工程において、前記化合物対の他方を固定化した固定相に該選別用物質及び標識化複合粒子の複合体を懸濁した液を接触させて、前記固定相に該複合体を結合させ、該固定相に結合した物以外の物を洗浄して除去し、前記標的保有体を変性して一本鎖にして標識化複合粒子を溶出して抽出又は分離によって回収するものである。

【0054】

【発明の実施の形態】

続いて、本発明の実施の形態に係る標識化複合粒子並びにその製造方法及び使用方法について、図1～図9に基づいて説明する。また、この実施例の形態は特に指定のない限り本発明を制限するものではない。

【0055】

図1には、第一の実施の形態に係る標識化複合粒子10及び標識化複合粒子16を示す。該標識化複合粒子10は、図1(a)に示すように、1個の微小粒子としての磁性体粒子11と、所定の種類（説明の簡単のため2種類としている）が所定の量比で含まれる標識物質としての蛍光物質13（○）、15（△）と、一端14で該微小粒子11にビオチンとアビジンとの特異的結合、吸着又は共有結合等の化学的物理的結合を含む結合を利用して前記磁性体粒子11に結合され、他端が蛍光物質13、15に結合し、所定の塩基配列をもつDNA断片（実線）を標的として保有する多数本の標的保有体12とを有する。尚、前記蛍光物質13は、例えば、FITC（緑色）であり、蛍光物質15は、例えば、ローダミン（オレンジ色）又はCy5（サイ・ファイブ、赤色）である。該蛍光物質13と蛍光物質15は、励起波長、発光波長等で識別されるものである。

【0056】

図1(a)では、蛍光物質13と蛍光物質15との量比が、例えば4対1の場合を、説明の簡単のために5本の標的保有体12で図示する。他方、図1(b)に示す標識化複合粒子16は、前記標的保有体12であるDNA断片とは異なる種類の塩基配列をもつDNA断片（点線）をもつ標的保有体17を示す。尚、図1(a)と同一の符号は同一の物を示すものである。本実施の形態では、微小粒子に磁性体粒子11を用いているので、単に標的保有体12をまとめて担持するだけでなく、磁場によって標識化複合粒子11、16を遠隔操作することができる。特に、磁力手段を設けたピペット手段を用いることによって、種々の操作を自動化することができる。

【0057】

次に、このような標識化複合粒子が、蛍光を用いた標識物質によって識別可能であることを簡単な実施例で以下に示す。

該実施例では、ビーズ（微小粒子）に、前記標的保有体として適当な塩基配列をもつDNA断片の一端を固定し、他端に2種類の蛍光物質、ここでは、Cy5（赤色）とFITC（緑色）の量比を変えたものを結合した標識化複合粒子について、個々に蛍光強度を測定して、測定結果について統計処理を行ったものである。

【0058】

本実施例では、2種類の蛍光物質、Cy5とFITCの総量を変えず全光量を略一定にし、量比のみを8通りに変えて標識化した標識化複合粒子について、識別の程度を測定したものである。やり方は、個々のビーズのCy5とFITCとの各蛍光強度を測定して数値化し、Cy5とFITCの蛍光強度の比を計算し、図2に示すビーズの蛍光強度の分布を示す実験結果を得たものである。

【0059】

図2中「N」、「Min」、「Max」、「Avr.」、「SD」は、それぞれ、測定したビーズの個数、比の最小値、比の最大値、比の平均、比の標準偏差を示すものである。サンプルf01は、Cy5:FITC=0.1:0.9、サンプルf02は、Cy5:FITC=0.2:0.8…のように、総量を一定にし、量比のみを8通り変えたものを用意している。蛍光強度の分布が正規分布をしていると仮定すると、Avr.-SDとAvr.+SDの範囲に入る蛍光強度比を有するビーズは約68%であり、Avr.-2SDからAvr.+2SDの範囲に入るものは約95%となる。図2のAvr.-2SDとAvr.+2SDの列をみていくと、

f03 0.46~0.47

f04 0.49~0.86

f08 0.89~1.00

となる。このように選択するとどの区分も重なり合わないことから、少なくともこの4階調は危険率5%以下で分離、識別できることになる。この実験例では、時間を節約するために、個々の測定したビーズの蛍光の絶対強度が異常なものや複数のビーズが重なったもの等を完全には除外していないが、これらを除外することによってさらに階調度の分離精度を上げることができる。また、サンプル数を増加させることによって、統計誤差をさらに小さくすることができる。

【0060】

この実施例では、全量がCy5 の場合を含めると、5 階調を分離することができることになる。同様にして、さらに蛍光物質の種類を増やし、単純にこのような組み合わせを、例えば9 組用いれば、約200 万種類を識別することができることになる。

【0061】

続いて、第二の実施の形態に係る標識化複合粒子10の製造方法について、図3に基づいて説明する。

図3に示すように、標識化複合粒子10を製造するには、例えば、二本鎖のDNA20について、DNA領域20aの一本鎖に対応するRNA断片を第1のプライマ21とし、DNA領域20cの他の一本鎖に対応するRNA断片を第2のプライマ22とする。第1のプライマ21は、蛍光物質13又は蛍光物質15と共有結合等で予め結合させている。また、第2のプライマ22はビオチン18と予め共有結合等で結合している。こうして、PCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法）によって、2種類の前記プライマ21、22とDNA合成酵素（ポリメラーゼ）によってDNA合成反応を繰り返すことによって、所定の塩基配列をもつDNA断片20bを合成して、無制限に増幅することができる。

【0062】

PCR法は、該DNA断片20bを熱処理で一本鎖にした後、第1プライマ21、第2プライマ22を用い、DNA合成酵素を作用させて二本鎖を再生し、さらに熱変性によって一本鎖するという作業を繰り返すことによって、図2(c)に示すような、二本鎖のDNA断片20bの一本鎖23に蛍光13が結合し、他の一本鎖24にビオチン18が結合した標的保有体と、一本鎖23に蛍光15が結合し、他の一本鎖24にビオチン18が結合した標的保有体とが、4対1の本数比で増幅して得られる。

【0063】

このようにして得られた数万以上というオーダの標的保有体12が懸濁した溶液の中に、磁性体粒子で形成された複数個の微小粒子（ビーズ）11が懸濁した液又は微小粒子11のみを、例えば、磁力手段を液通路に近接且つ離間可能に備

えたピペット手段を用いて、分注することによって混合、懸濁又は攪拌する。

【0064】

該微小粒子11は、予め、前記前記ビオチン18と特異的に反応して結合するアビジンを表面にコーティングしておく。すると、該微小粒子11を標的保有体12の懸濁液中に混合、懸濁又は攪拌することによって、各微小粒子11の表面にビオチン18が結合している標的保有体12の一端が反応して結合し固定化される。その際、標的保有体12の数が多数であるため、微小粒子11に結合した標的保有体12の他端に結合されている前記蛍光物質13及び蛍光物質15の量比は、該懸濁液中の量比をほぼ忠実に反映し、一定の統計誤差内で4対1で結合することになる。この統計誤差は、一様且つ均一に懸濁している前記標的保有体12の量を増加させるに従って、殆ど無視しうる程度にまで収束する。

【0065】

該微小粒子11に結合する標的保有体12の数は、標的保有体12の数や、反応時間等の条件を変えることによって、コントロールすることができる。該数については、蛍光物質間にエネルギー遷移やクエンチングによる大きな影響が生じない範囲で、増加させることにより、発光強度や捕獲能力を高めることができる。

【0066】

次に、図4に基づいて、第三の実施の形態に係る該標識化複合粒子の製造方法について説明する。

図4(a)に示すように、例えば、制限酵素での切断が可能な切断可能配列29をもつ二本鎖の所定の塩基配列をもつ鋳型DNA(cDNA)断片27、28と、蛍光物質25と結合したプライマ26を用いて、前述したPCRによって、標的保有体を複製且つ増幅する。

【0067】

二本鎖の前記鋳型DNA断片27、28を熱処理によって一本鎖の鋳型DNA断片27と一本鎖の鋳型DNA断片28とし、プライマ26と、DNA合成酵素によってDNA合成反応の繰返しによって、該二本鎖のDNA断片を、例えば数十万倍以上に増幅する。

【0068】

図4 (b) に示すように、このようにして得られた二本鎖のDNA断片に対し、制限酵素を加える。制限酵素は、該蛍光物質25が結合していない方に存在する前記切断可能配列29を認識して、該DNA断片を切断する。

【0069】

図4 (c) で、切断処理された端部と結合可能なDNAリガーゼからなるアダプタ31と結合したビオチン30を該DNA断片の懸濁液に加える。その際、該ビオチン30は、前記蛍光が結合している方の一本鎖側に結合するようにアダプタ31と結合する。図4 (d) で、該ビオチン30はアダプタ31を介して前記切断処理された標的保有体に結合することになる。このようにして、一本鎖の片側にのみ蛍光物質25と、ビオチン30が結合している標的保有体を得られたことになる。尚、該標的保有体を微小粒子に結合して固定化する工程は、既に説明した工程と同様なので、説明を省略する。

【0070】

続いて、第四の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法について説明する。

ここでは、蛋白質32と相互作用を有するDNA断片の塩基配列を見出すために標識化複合粒子を用いるものである。

図5に示すように、複数種類の標識化複合粒子群、ここでは、説明の簡単のために2種類の標識化複合粒子33、34を用意する。標識化複合粒子33と標識化複合粒子34が含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。該標的保有体の一端は両粒子33、34とも各微小粒子に固定されているが、その他端は2種類の蛍光物質13 (○)、15 (△) が、標識化複合粒子33では4対1の量比で結合し、標識化複合粒子34では1対4の異なる量比で結合している。この量比の差によって該標識化複合粒子33、34が有する塩基配列を標識化している。

【0071】

最初に、該標識化複合粒子33、34を混合した懸濁液を容器に収容しておく。該容器内に、該標識化複合粒子33、34を標識化した標識物質である蛍光物質13 (○)、15 (△) と異なる蛍光物質19 (□) で標識化した選別用物質

である蛋白質32を加える。一定時間経過後に該蛍光物質19を追跡することによって、蛋白質32がどちらの標識化複合粒子33、34に保持されたか、又は保持されなかったかを調べる。蛋白質32が標識化複合粒子33、34のどちらにも保持されなかった場合には、該蛋白質32と該DNA断片の塩基配列との間の関連性がない又は極めて低いことが見出される。

【0072】

一方、蛋白質32が標識化複合粒子33、34のいずれかに保持されたと解析した場合には、該蛋白質32が結合した標識化複合粒子(33)を選別する。選別された標識化複合粒子(33)の前記蛍光物質13(O)、15(Δ)の発光強度を測定することによって、その量比を算定し、蛋白質32を保持した標識化複合粒子33から、標識化された塩基配列を識別することができる。これによって、蛋白質32と結合しうる親和性の高い、又は関連性の高い塩基配列が特定される。

【0073】

もし、該標識化複合粒子33、34の双方に蛋白質32が保持されたことを解析した場合には、蛋白質32との親和性等の関連性の程度は、各標識化複合粒子33、34が保持した蛋白質32の量の比較又は蛋白質32を保持した標識化複合粒子33、34の個数比によって親和性の程度等の関連性の高低を判断することもできる。

【0074】

本実施の形態において、前記標的保有体を複数種類のDNA断片で形成する代わりに、複数種類の蛋白質等で形成し、該標識化複合粒子を懸濁した液に、選別用物質として、該標識化複合粒子に用いた標識物質と異なる種類の標識物質で標識化した特定の塩基配列をもつDNA断片を混合するようにしても良い。この場合には、該塩基配列をもつDNA断片と親和性の高い蛋白質が逆に特定されことになる。

【0075】

本実施の形態は、蛋白質とDNA断片との間に限られず、DNA断片同士間についても適用することができる。これによって、DNA断片の塩基配列間の相補

性、相同性の高い構造、相互作用の強さ等の関連性を見出すことができる。尚、本実施形態では、各標識化複合粒子に磁性体粒子を用い、磁力手段を設けたピペット手段又はこれらのピペット手段を複数集積化した装置を用いることによって、その懸濁、攪拌、分離、移送等の作業を自動化することができる。

【0076】

次に、第五の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法について、図6に基づいて説明する。

図6(a)に示すように、複数種類の標識化複合粒子、例えば、2種類の標識化複合粒子35、36を用意する。各標識化複合粒子35と標識化複合粒子36が含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。該標的保有体の一端は両粒子35、36とも各微小粒子に固定されているが、その他端は2種類の蛍光物質13(O)、15(Δ)が、標識化複合粒子35では4対1の量比で結合し、標識化複合粒子36では1対4の量比で結合したものである。該2種類の標識化複合粒子35、36を混合した懸濁液を、選別用物質であるDNA結合蛋白質38が固定化されたマトリクス(固定相)37と接触させるために、該マトリクス37が設けられている容器に分注する。

【0077】

すると、該DNA蛋白質38と特異的に反応して結合する塩基配列をもつDNA断片の標的保有体をもつ標識化複合粒子35が該蛋白質38と結合して該マトリクス37に捕獲される。その後、該マトリクス37に捕獲されていない標識化複合粒子35、36を洗浄した後、捕獲された該標識化複合粒子35を塩溶液で溶出することによって該当する標識化複合粒子35が選別され、蛍光スペクトルを観測して標識化複合粒子35を識別する。

【0078】

このようにして、該塩基配列との結合に特異性をもつ蛋白質を同定することによって、転写制御因子のような、遺伝子をコントロールすることのできる蛋白質を見出し、生物の発生、ガン等の研究に役立たせることができる。

【0079】

第五の実施の形態の他の応用例として、図6(d)に示す例を説明する。

図6(d)に示すように、例えば、2種類の標識化複合粒子35a, 36aを用意する。標識化複合粒子35aと標識化複合粒子36aが含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。標的保有体には、2種類の蛍光物質13(○)、15(△)が、該標識化複合粒子35aでは4対1の量比で結合し、標識化複合粒子36aでは1対4の量比で結合している。本実施の形態では、該2種類の標識化複合粒子35a, 36aの微小粒子は磁性体粒子で形成され、外部磁場が及ぼされると磁化され外部磁場が除去されると消磁される。該2種類の標識化複合粒子35a, 36aを混合した懸濁液を、選別用物質であるDNA結合蛋白質38が固定化された磁性体粒子37aと接触させるために、ピペット手段等によって、該磁性体粒子37aが懸濁する液が収容された容器又はカラム39等に分注する。

【0080】

ここで、前記標識化複合粒子35a, 36aが有する磁性体粒子は、DNA結合蛋白質38が固定化された磁性体粒子37aに比べ同一磁場から受ける磁力が小さいものとする。受ける磁力を小さくするには、同一素材で径を小さく形成するか又は磁化率の小さい素材を用いる。磁力体がピペット手段の液通路の外部に組み込まれて、液通路内へ磁場を及ぼし又は除去可能なピペット手段を用いることによって、標識化複合粒子35a, 36aや磁性体粒子37aの移送や分離等の作業が容易化され且つ自動化される。

【0081】

また、該磁性体粒子37aは、同一の磁場に対して、該標識化複合粒子35a, 36aに含有する磁性体粒子よりも強い磁力を受ける。したがって、該磁性体粒子37a及び標識化複合粒子35a, 36aが懸濁する液体が収容された容器、ピペット手段の液通路やカラム39に所定の磁場をかけた状態で、該懸濁液を所定の流速で流すことによって、該磁性体粒子37aのDNA結合蛋白質38に捕獲された標識化複合粒子は、磁性体粒子37aとともに、該容器等の内壁に吸着して分離されるが、該磁性体粒子37aに捕獲されなかった標識化複合粒子は、内壁に吸着する磁力が弱いため、懸濁液とともに流出することによって選別される。

【0082】

尚、前記標識化複合粒子の微小粒子として、非磁性体粒子を用いても良い。この場合には、標識化複合粒子に対する磁場の影響は0であるので、捕獲されなかった標識化複合粒子の流出を確実に行うことができる。

【0083】

続いて、第六の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法について、図7に基づいて説明する。

図7(a)に示すように、例えば、2種類の標識化複合粒子40、41を用意する。標識化複合粒子40と標識化複合粒子41が含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつ二本鎖のDNA断片で形成されている。該標識化複合粒子40、41を標識化するために、その標的保有体の他端には、2種類の蛍光物質13(O)、蛍光物質15(Δ)が標識化複合粒子40では4対1の量比で結合したものであり、標識化複合粒子41では1対4の量比で結合したものである。図7(b)で、該2種類の標識化複合粒子40、41の標的保有体をアルカリ性溶液等で変性して一本鎖化する。

【0084】

図7(c)で、検査用FITC42で標識化された選別用物質である一本鎖DNA断片43を、前記変性された標識化複合粒子40、41が懸濁している懸濁液中に混合し、図7(d)で示すように、該一本鎖DNA断片43と、該標識化複合粒子40、41の一方とハイブリダイズするか否かを試みる。ここでは、FITC42は、アンチFITC抗体44と特異的に反応する性質をもつ標識化物質として利用したものである。図7(e)で、該一本鎖DNA断片43がハイブリダイズした標識化複合粒子40とハイブリダイズしなかった標識化複合粒子41の混合した懸濁液を、アンチFITC抗体44が固定化されたマトリクス45を収容した容器に分注する。図7(f)で、該マトリクス45に捕獲されなかった標識化複合粒子40、41を洗浄して選別した後、変性して標識化複合粒子40を溶出し、蛍光スペクトルで識別する。

【0085】

第六の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法の他の応用例として、図7

(g) に基づいて説明する。

図7 (g) に示すように、例えば、2種類の標識化複合粒子40a, 41aを用意する。標識化複合粒子40aと標識化複合粒子41aが含有する各標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。標的保有体には、2種類の蛍光物質13 (○)、15 (△) が、該標識化複合粒子40aでは4対1の量比で結合し、標識化複合粒子41aでは、1対4の量比で結合している。本例では、該2種類の標識化複合粒子40a, 41aの微小粒子は磁性体粒子で形成され、外部磁場が及ぼされると磁化され外部磁場が除去されると消磁される。該2種類の標識化複合粒子40a, 41aの標的保有体はアルカリ性溶液等で変性して一本鎖化されている。

【0086】

検査用のFITC42で標識化された一本鎖DNA断片43を前記変性された標識化複合粒子40a, 41aが懸濁している懸濁液中に混合し、該一本鎖DNA断片43と、該標識化複合粒子40a, 41aの一方とハイブリダイスする可否を試みる。図7 (g) に示すように、該一本鎖DNA断片43がハイブリダイズした標識化複合粒子40とハイブリダイズしなかった標識化複合粒子41の混合した懸濁液を、アンチFITC抗体44が固定化された磁性体粒子45aの懸濁液を収容した容器、カラム39等に分注する。ここで、該標識化複合粒子40a, 41aが有する磁性体粒子は、アンチFITC抗体44が固定化された磁性体粒子45aに比べ同一磁場から受ける磁力が小さいものとする。磁力体がピペット手段の液通路の外部に組み込まれて、液通路内への磁場を及ぼし又は除去可能なピペット手段を用いることによって、標識化複合粒子40a, 41aや磁性体粒子45aの移送や分離等の作業が容易化され且つ自動化される。

【0087】

また、該磁性体粒子45aは、同一の磁場に対して、該標識化複合粒子40a, 41aに含有する磁性体粒子よりも強い磁力を受ける。したがって、該磁性体粒子37a及び標識化複合粒子40a, 41aが懸濁する液体が収容された容器、ピペット手段の液通路やカラム39に所定の磁場をかけた状態で、該懸濁液を所定の収束で流すことによって、該磁性体粒子45aのアンチFITC抗体44

に捕獲された標識化複合粒子は、磁性体粒子45aとともに、該容器等の内壁に吸着して分離されるが、該磁性体粒子45aに捕獲されなかった標識化複合粒子は、内壁に吸着する磁力が弱いため、懸濁液とともに流出して選別することができる。

【0088】

尚、前記標識化複合粒子の微小粒子として、非磁性体粒子を用いても良い。この場合には、標識化複合粒子に対する磁場の影響は0であるので、捕獲されなかった標識化複合粒子の流出による選別はより確実に行うことができる。

【0089】

第七の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法について、図8に基づいて説明する。

図8(a)に示すように、例えば、2種類の標識化複合粒子46、47を用意する。標識化複合粒子46と標識化複合粒子47が含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。標的保有体には、2種類の蛍光物質13(O)、蛍光物質15(Δ)が該標識化複合粒子46では4対1で結合し、該標識化複合粒子47では1対4の量比で結合している。図8(b)で、該2種類の標識化複合粒子46、47を混合した懸濁液中に、蛍光物質48で標識化された標的であるDNA結合蛋白質48が混合される。

【0090】

図8(c)で、該標識化複合粒子46に該DNA結合蛋白質48が結合したとする。図8(d)でDNA結合蛋白質48が標識化する蛍光物質48の蛍光スペクトルを測定することによって、該DNA結合蛋白質48が捕獲された標識化複合粒子46を選別する。その後、図8(e)で、標識化された該蛋白質48を除去した後、該標識化複合粒子46を蛍光で識別する。

【0091】

次に、第八の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法について、図9に基づいて説明する。

図9(a)に示すように、例えば、2種類の標識化複合粒子50、51を用意する。各標識化複合粒子50、51には、各々標的保有体がその一端で固定され

ている。標識化複合粒子50と標識化複合粒子51の標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。標的保有体の他端は、2種類の蛍光物質13 (○)、蛍光物質15 (△) が、標識化複合粒子50では4対1の量比で結合し、標識化複合粒子51では1対4の量比で結合している。図9 (b) で、該2種類の標識化複合粒子50、51を変性して一本鎖化する。図9 (c) で、選別用物質として蛍光52で標識化した一本鎖DNA53を前記懸濁液中に混合させる。

【0092】

図9 (d) で、例えば、標識化複合粒子50の標的保有体とのハイブリダイズによって捕獲される。図9 (e) で、蛍光スペクトルで各標識化複合粒子50、51で1粒子毎に、前記蛍光52の有無を蛍光スペクトルを測定することによって、標識化された該一本鎖DNAを捕獲した標識化複合粒子50を選別する。その後、図9 (f) で、標識化された該一本鎖53を除去した後、該標識化複合粒子50を蛍光で識別する。

【0093】

第九の実施の形態として、明瞭に外見上個々には現れにくい影響や変化を明瞭且つ効率良く識別観測するために標識化複合粒子を使用する方法について説明する。

温度、放射線量、圧力、重力、磁場、電場、濃度 (毒性、試薬等)、電磁波 (可視光線、紫外線、X線等)、粒子線、音響等又はこれらを組み合わせたものによる影響が明瞭に外見上の差異が現れにくい程度である場合に、該影響を顕在化し又は統計的に測定するために標識化複合粒子を使用するものである。本例では、蛋白質やDNA断片等の同一の標的を多数含有したサンプル群を予め用意し、各サンプルに前記影響を及ぼし若しくは段階的に変えたレベル若しくはそれらの組み合わせを及ぼしたものと、及ぼさなかったものを作る。これらの各サンプルを識別するために、該サンプル数分の種類の標識化複合粒子の懸濁液を用意して、各サンプルと混合させて前記標的を各標的保有体に保持させて標識化する。ここで、各標識化複合粒子の標的保有体は、例えば、特殊なノリ物質が繊維状物質に付着され、種々の標的を保有することができるものである。

【0094】

該標的を保持した各標識化複合粒子を同一容器に混合して、同一時間、同一濃度等の同一条件で同一処理を一斉に加える。この処理とは、例えば、該蛋白質とDNA断片との親和性への影響を見るため、選別用物質として、別種の標識物質で標識化された該DNA断片を多数混合させる。該標識物質を解析することによって、該DNA断片が保持された前記標識化複合粒子を選別し、該標識化複合粒子の標識物質を解析することによって、最初に受けた影響を統計的に明瞭に顕在化させて迅速、且つ効率的に測定することができる。また、本例によれば、木目の細かいレベルによる標識化が可能なので、所定の影響を受ける臨界レベル等を精密に測定又は見出すことができる。

【0095】

以上説明した各実施の形態は、本発明をより良く理解させるために具体的に説明したものであって、別形態を制限するものではない。したがって、発明の主旨を変更しない範囲で変更可能である。例えば、以上の説明では、標識物質として2種類の蛍光物質を用いたが、該場合に限られることなく多種類又は燐光物質であっても良い。また、恰も5個の標的保有体が微小粒子に固定されている場合のみについて説明したが、これは説明の簡単のためで、量比を説明しやすくするために用いたものである。さらに、以上の説明は、標的保有体として、DNA断片を用いた場合のみを説明したがこの場合に限定されるものではない。2種類の蛍光物質が標識化複合粒子に用いられた場合についてのみ説明したが、該場合に限られることはない。また、以上の実施の形態では、標識化複合粒子を製造する際に、核酸をPCR法を用いて合成及び増幅する場合について説明したが、該場合に限られることなく、例えば、互いに相補的な一本鎖を合成してアニーリングによって二本鎖を形成することによって製造するものであっても良い。

【0096】

【発明の効果】

第一の発明、第十二の発明又は第二十の発明によると、微小粒子及び標識物質と結合するとともに、標識物質の種類及び量比によって対応付けることが可能な標的を保有又は保有可能とする標的保有体を多数有するように構成、製造又は使

用するものである。

【0097】

本発明によれば、標識物質の種類及び量比を種々に特定することによって、数百、数千、数万のオーダー以上の種々の標的を対応付けて識別することが可能となる。また、本発明によれば、微小粒子表面上、標識用領域の増加と、標的保有用領域の増加とが狭い微小粒子表面で拮抗せず、むしろ、標的保有体の増加は、標的保有能力の増加と標識物質量の増加との双方をもたらし、識別数を含む識別能力を増加させることになる。また、標的保有体のみを変えることによって、多様で汎用的な処理が可能となる。

【0098】

また、本発明は標的保有体を介して標識物質を結合させ、微小粒子に直接標識物質を結合させるものではない。従って、標識物質間の間隔を、微小粒子に直接結合するものに比べ、より広くとることができるので、標識物質間のエネルギー遷移やクエンチング（発光物質を用いた場合）等の相互作用を防止して、多数の物質を高精度且つ安定的に識別することを可能とする。

【0099】

本発明によれば、種々の標識化複合粒子を同一容器に混合して一斉に処理を行っても、各標的は標識化されているので、各標的毎に処理結果を得ることができる。従って、各標的を識別するために多数の容器を用意する必要がなく、迅速且つ効率的に行うことができる。

【0100】

第二の発明は、1個の標的保有体に対しては、1種類の標識物質が結合するようにしたものである。したがって、結合する標識物質の種類が異なる該標的保有体の個数を量比に応じて定めることができるので、構成が簡単かつ製造が容易となる。

【0101】

第三の発明は、標的保有体を、一端で前記微小粒子に固定され、他端で前記標識物質と結合した長細状に形成したものである。従って、標識物質間の間隔を、微小粒子に直接結合するものに比べてより広くとることができるので、標識物質

間のエネルギー遷移やクエンチング（発光物質の場合）等による相互作用を防止して、例えば、数千、数万以上というような多数の物質を高精度且つ安定的に識別することができる。

【0102】

第四の発明は、前記標的保有体として、核酸、又は核酸以外の物質を用いることができる。例えば、核酸を用いた場合には、種々の蛋白質の中から、種々の塩基配列に対して転写の制御を行うことができる転写制御因子や異なる塩基配列を有するDNA断片を、多数の蛋白質又は塩基配列等の物質をきめ細かく標識化することによって、迅速且つ容易に発見することができる。これによって、ガンや生物の発生等の研究への多大の寄与をすることができる。その他、種々の物質を用いることによって種々の物質間の関連性、例えば、相互作用の強さ、構造の類似性等を認識することができる。

【0103】

第五の発明によれば、前記標的保有体は、二本鎖の塩基配列をもつ核酸からなり、標識物質は一本鎖にのみ結合し、同一の一本鎖の他端に前記微小粒子が結合したものである。従って、本発明によれば、二本鎖の核酸を標識物質によって、明瞭に識別することができる。

【0104】

第六の発明又は第七の発明によれば、前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記標識物質は、一本鎖の一端にのみ結合し、同一の該一本鎖の他端に前記微小粒子が結合したものの、又は一本鎖の核酸を用いたものである。従って、本発明によれば、該標的保有体を一本鎖に変性することによって、相補性や相同性等の関連性の高い塩基配列の組み合わせをハイブリダイズによって、迅速且つ確実に見極めることができる。

【0105】

第八の発明は、標識物質として、蛍光又は燐光等のルミネッセンスによる発光物質を用いたものである。これによって、標的の識別能力を高めるとともに、安定して且つ高い信頼性を得ることができる。

【0106】

第九の発明は、前記発光物質の種類は、励起波長、発光波長、発光強度、発光位相又は発光寿命のいずれかによって識別可能である。これによって又はこれらを組み合わせることによって、発光物質の種々の性質の相違を利用して、多数種類の標識化を可能とする。

【0107】

第十の発明は、前記微小粒子への固定化には、ビオチンとアビジン等の特異的に結合する化合物対を利用したものである。従って、安価、簡単且つ確実に、標的保有体を微小粒子に固定化することができる。

【0108】

第十一の発明は、磁性体粒子等の遠隔操作可能な遠隔作用体を用いて標識化複合粒子を形成したものである。本発明によれば、特に、磁性体粒子で微小粒子を形成した場合には、磁力手段をピペット手段の液通路内に及ぼす装置を用いることによって、分注、移動、懸濁、攪拌、分離、洗浄、回収、再懸濁等の処理を処理の開始から測定に至るまでを完全に自動化することができる。

【0109】

第十三の発明又は第十九の発明は、微小粒子に標的保有体を結合する場合に、結合されるべき標的保有体の種類等に応じて特定された種類及び量比をもつように標識物質と結合した標的保有体を多数液体に懸濁させたものに微小粒子を混合させるようにしている。したがって、微小粒子が接触して固定化する標的保有体はランダムに選択されるので、意図した種類及び量比を統計誤差内で忠実に反映した標識物質をもった標識化複合粒子を簡単に且つ精度良く製造することができる。

【0110】

第十四の発明は、二本鎖からなる標的保有体を生成する場合、標識物質と結合した所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸と、該塩基配列と関連性の高い塩基配列をもつ他の一本鎖の核酸を合成し、これらをアニーリングによって二本鎖の核酸を生成するものである。本発明によれば、安価に且つ容易に種々の標的保有体を生成することができる。

【0111】

第十五の発明によれば、プライマを用いて、二本鎖の核酸を合成及び増幅することによって標的保有体を生成するものである。これによって、容易、迅速且つ大量に標的保有体従って標識化複合粒子を製造することができる。

【0112】

第十六の発明又は第十七の発明は、二本鎖の核酸からなる標的保有体のうち、一本鎖側にのみ、標識物質及び粒子と結合させるように制限酵素を用いて製造するもの、又は二本鎖を変性によって一本鎖にするものである。従って、本発明によれば、標識の標的である塩基配列と相補性又は相同性等の関連性の高い塩基配列を見出すための標識化複合粒子を容易且つ大量に製造することができる。

【0113】

第十八の発明は、微小粒子が有する多数の穴、間隙若しくは凹凸による付着、吸着、接着、共有結合、ビオチンとアビジン等の特異的反応等の結合を利用して、前記標的保有体の端部と微小粒子とを結合固定するものである。これによって、種々の標識化複合粒子を得ることができるので多様な処理に使用することができる。

【0114】

第二十一の発明は、前記選別工程を磁力手段を設けたピペット手段によって行うものである。これによって、各種作業またはその組み合わせを自動的に、迅速、容易、効率的且つ精度良く実行することができる。

【0115】

第二十二の発明は、複数種類の標識化複合粒子群と、目的とする標識化複合粒子を選別するために、選別用物質を接触させて、該選別用物質と結合した標識化複合粒子を抽出又は分離して選別するものである。これによって、各標的と親和性の高い、又は何らかの相互作用のある標的保有体の組み合わせを知ることができる。これによって、相補性、相同性又は類似性のある構造等の何らかの関連性を知ることができるので、例えば、転写制御因子や異なる塩基配列を有するDNA断片を見極めることができる。

【0116】

第二十三の発明は、標識化した選別用物質を用いて、目的とする標識化複合粒

子を選別するものである。これによって、確実かつ容易に目的とする標識化複合粒子の選別及び識別を行うことができる。

【0117】

第二十四の発明は、発光物質の発光波長の各強度の測定結果に基づいて、予め定めた種類の予め定めた量比を割り出して、該当する標的を識別するものである。本発明によれば、容易に且つ確実に該当する標的を識別することができる。

【0118】

第二十五の発明は、前記標的保有体が、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸であって、前記標識物質及び前記微小粒子はその片側の一本鎖にのみ結合し、他方の一本鎖は変性によって除去したものであり、選別用物質は、検査用塩基配列をもつ検査用核酸である。本発明によれば、容易且つ効率的に、特定の塩基配列とハイブリダイズする、相補性又は相同性等の関連性の高い塩基配列を見出すことができる。

【0119】

第二十六の発明は、前記選別用物質が固定された固定相と前記標識化複合粒子が懸濁した液を接触させ、懸濁液を洗浄して除去した後、洗浄後に固定相から得られる発光等を測定するものである。本発明によれば、固定相に捕獲された標識化複合粒子以外のものを洗浄して除去して標識化複合粒子を選別するので、選別が容易且つ確実である。

【0120】

第二十七の発明は、前記固定相から物理的又は化学的に標識化複合粒子を溶出した後、該溶出液について発光を測定するものである。これによって、確実且つ容易に標識化複合粒子を識別することができる。

【0121】

第二十八の発明は、前記固定相として磁性体粒子を用い、標識化複合粒子の微小粒子についても、磁性体粒子を用いたものである。これによって、遠隔操作を利用することができるので、作業や処理を自動化し、迅速且つ容易に処理を行うことができる。

【0122】

第二十九の発明は、選別用物質及び標識化複合粒子の複合体を固定相に捕獲させ、該固定相に捕獲された以外の物を洗浄して除去し、前記標的保有体を変性して一本鎖にして標識複合粒子を溶出して発光等で識別するものである。本発明によれば、先ず、複合粒子を固定相に捕獲するとともに、捕獲された複合粒子を抽出して選別するようにしているので、標識化複合粒子を確実に且つ精度良く識別することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の第一の実施の形態に係る標識化複合粒子を示す図

【図 2】

本発明の第一の実施の形態に係る標識化複合粒子の実施例を示す図

【図 3】

本発明の第二の実施の形態に係る標識化複合粒子の製造方法を示す図

【図 4】

本発明の第三の実施の形態に係る標識化複合粒子の製造方法を示す図

【図 5】

本発明の第四の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図

【図 6】

本発明の第五の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図

【図 7】

本発明の第六の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図

【図 8】

本発明の第七の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図

【図 9】

本発明の第八の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図

【符号の説明】

10、16、33、34、35、36、35a、36a、40、41、40a、41a、46、47、50、51…標識化複合粒子

11…微小粒子

12、17…標的保有体

13、15…蛍光物質

37、45…マトリクス

37a、45a…磁性体粒子

39…カラム

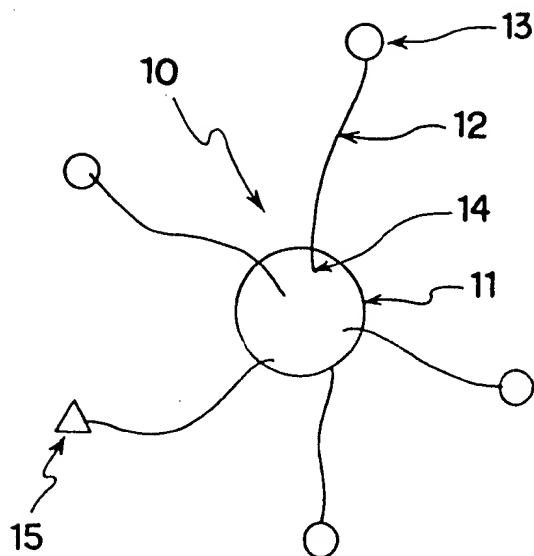
39a…磁力手段

【書類名】

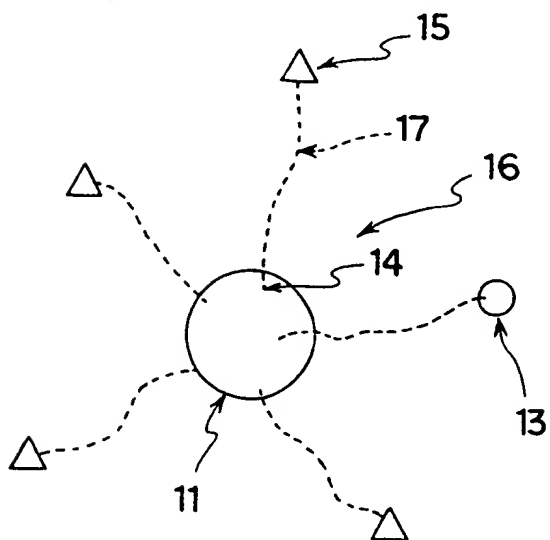
図面

【図 1】

(a)



(b)



【図 2】

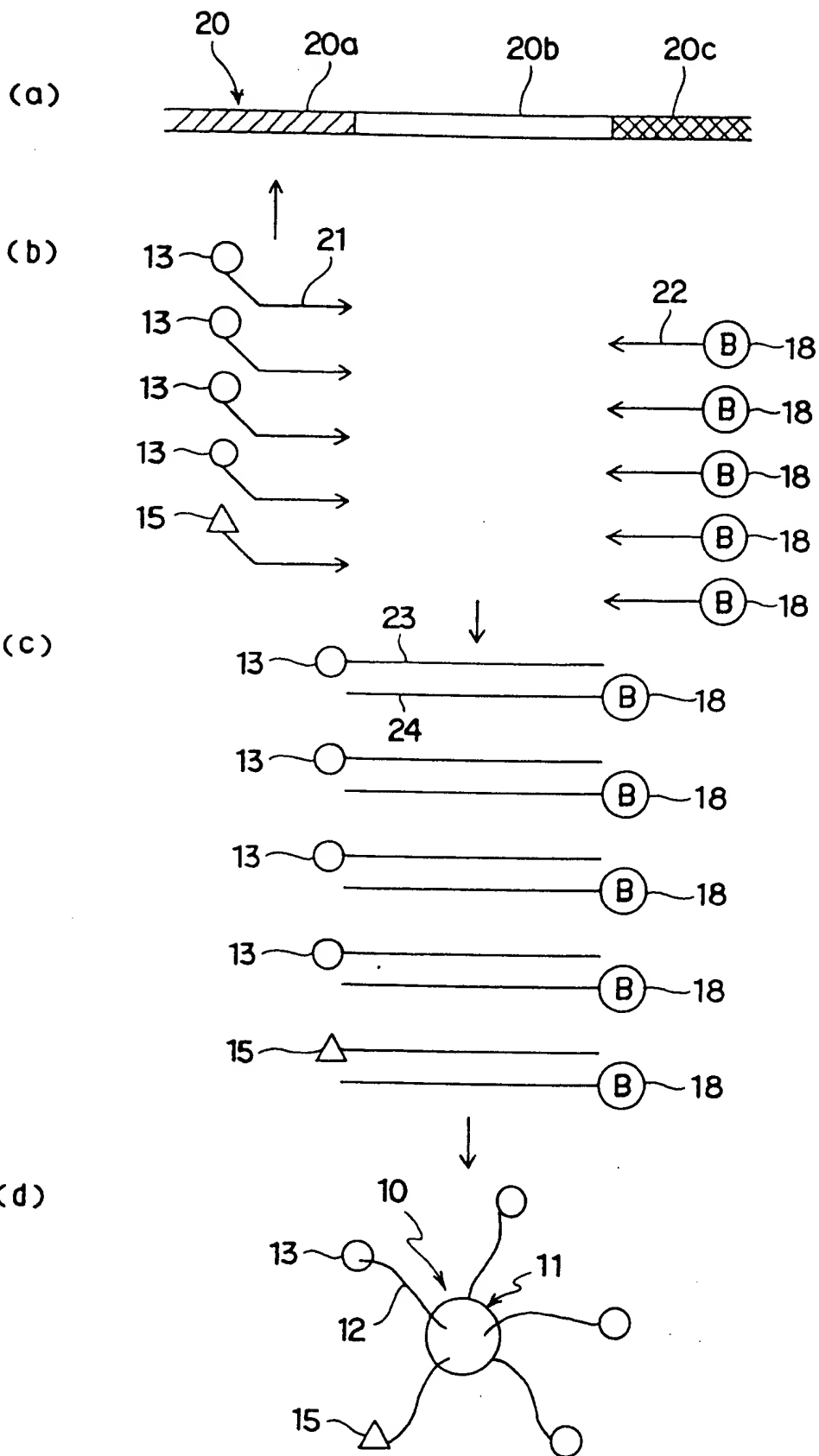
蛍光強度の分布

	N	Min	Max	A v r .	S D	Avr. -SD	Avr. +SD	Avr. - 2SD	Avr. + 2SD
f 0 1	42	0.142993	0.406137	0.254914	0.05643	0.198484	0.311343	0.142055	0.367773
f 0 2	19	0.292171	0.53012	0.417913	0.072025	0.345888	0.489938	0.273863	0.561963
f 0 3	26	0.459459	0.470588	0.465754	0.003063	0.462691	0.468816	0.459629	0.471879
f 0 4	49	0.292941	0.802867	0.676116	0.094861	0.581255	0.770977	0.486394	0.865837
f 0 5	26	0.605479	0.912201	0.827762	0.080635	0.747127	0.908397	0.666491	0.989032
f 0 6	14	0.620214	0.8976	0.798381	0.083749	0.714632	0.882129	0.630883	0.965878
f 0 7	27	0.798176	0.956643	0.886976	0.046024	0.840952	0.933	0.794928	0.979024
f 0 8	7	0.888403	0.982348	0.946348	0.030086	0.916262	0.976435	0.886175	1.006521

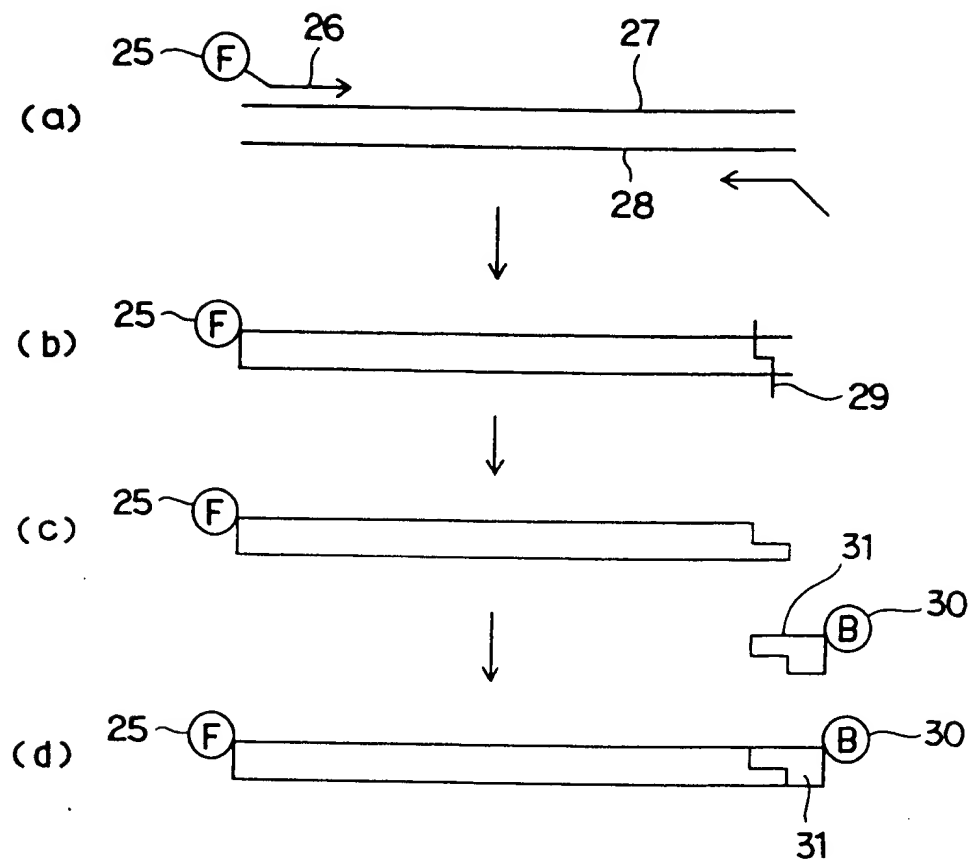
特平 10—206057



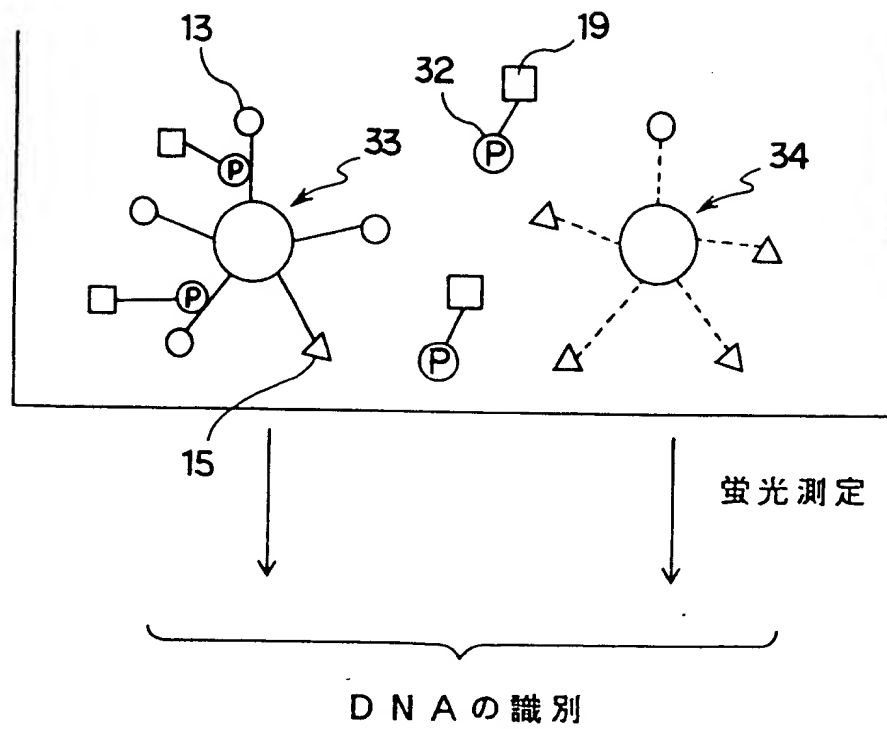
【图 3】



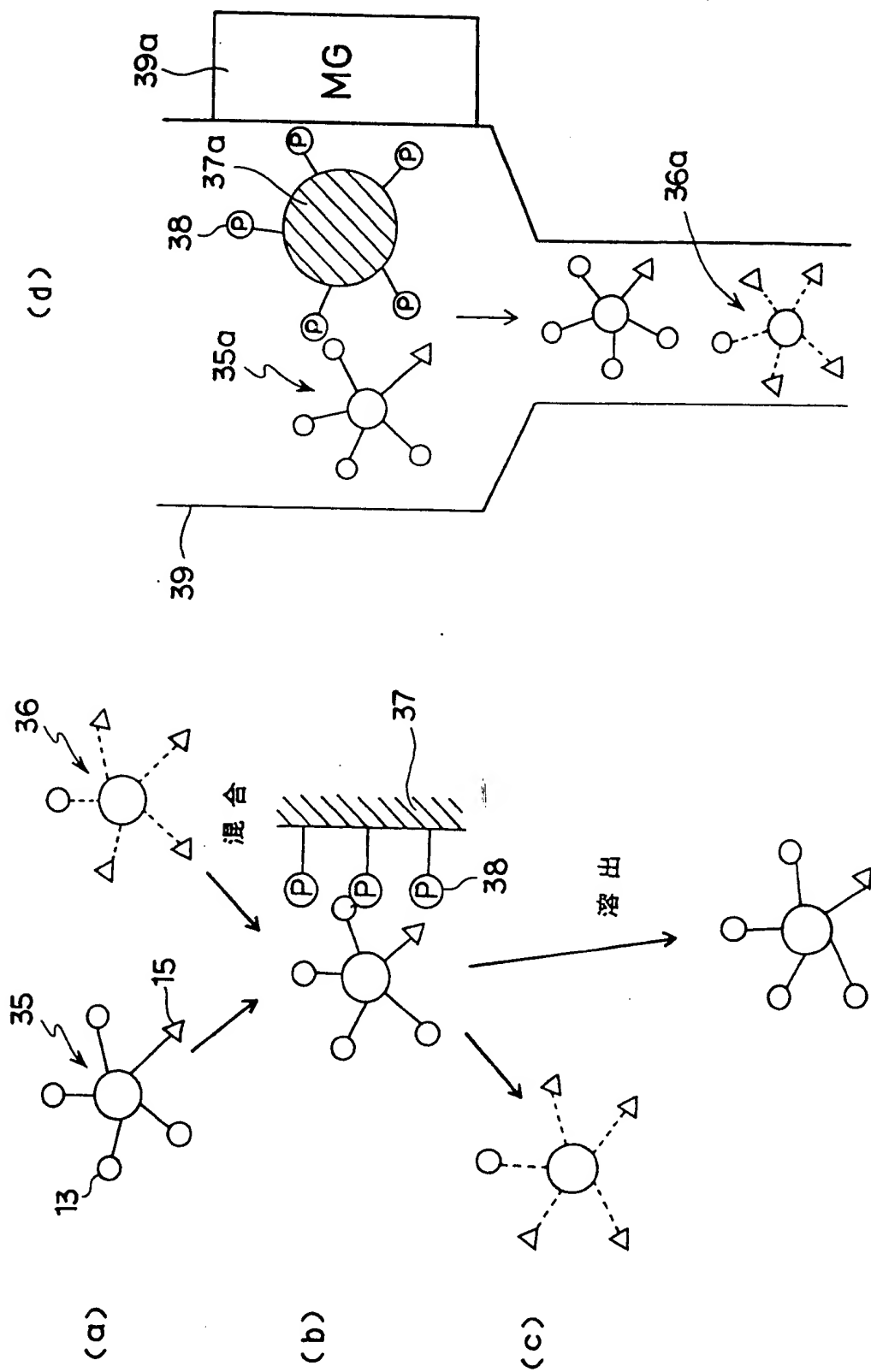
【图 4】



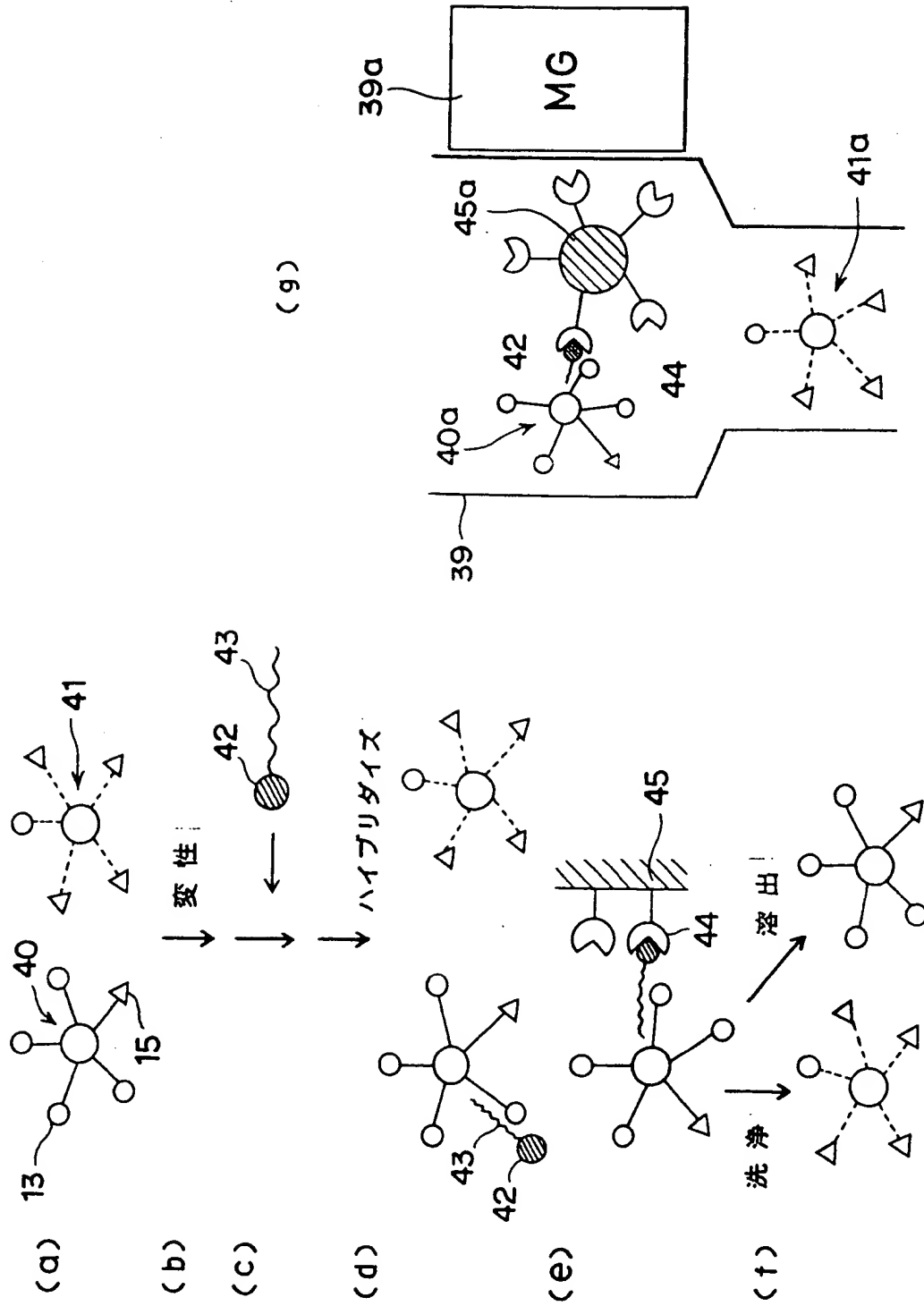
【図 5】



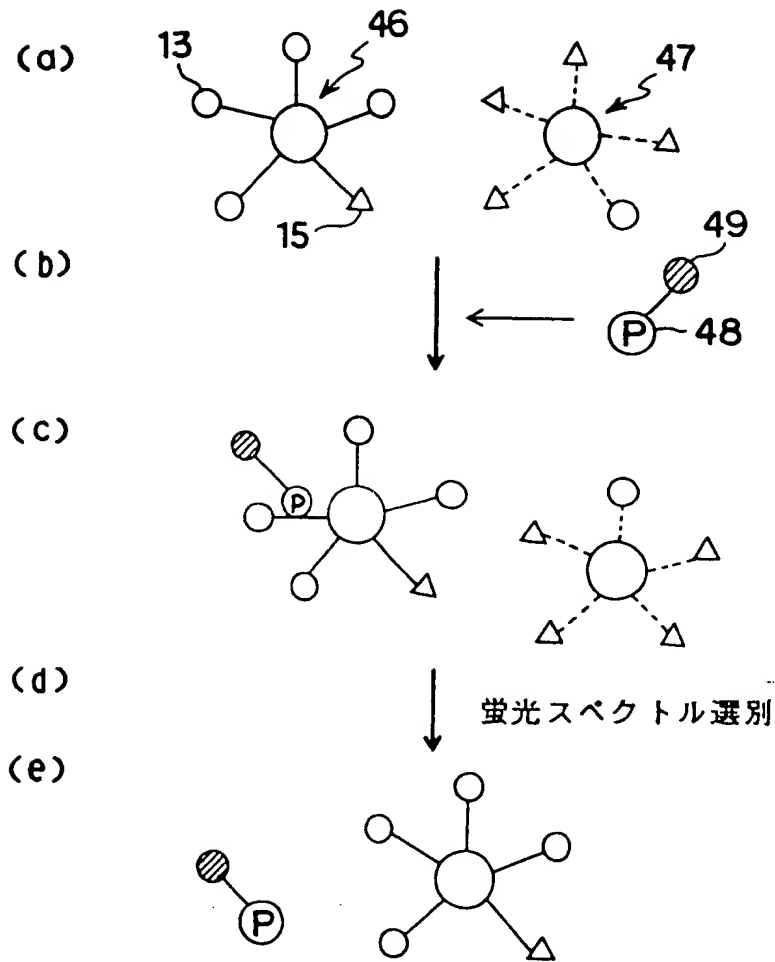
【图6】



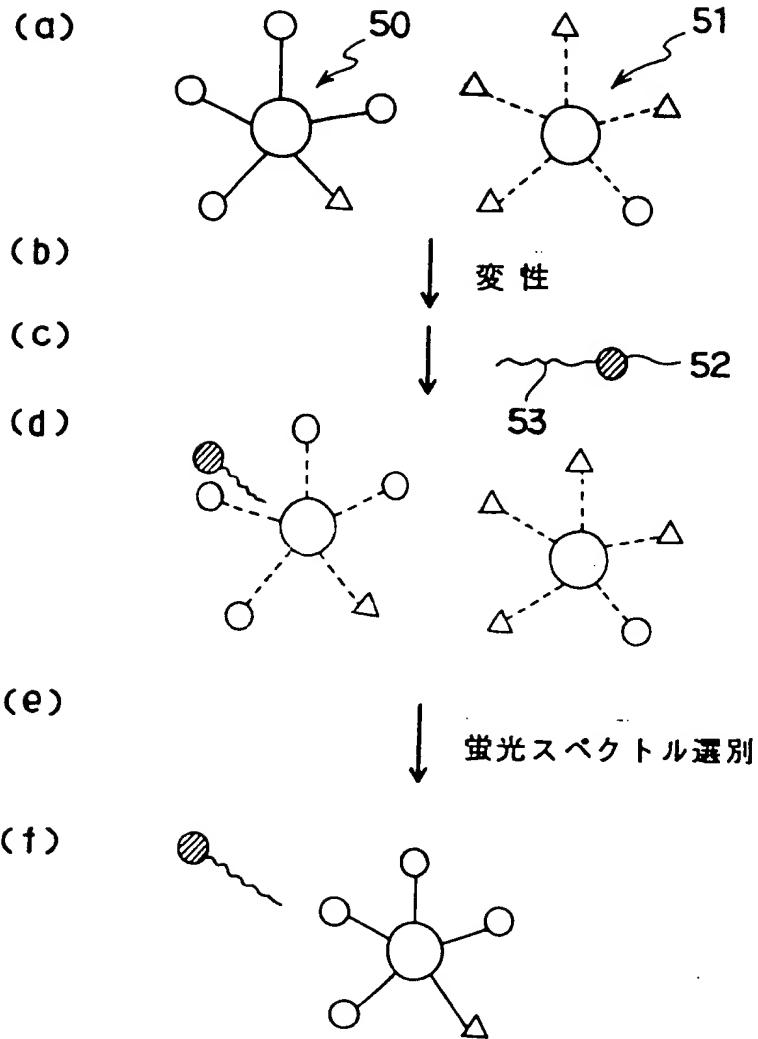
【図7】



【図8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 標識化複合粒子並びにその製造方法及び使用方法に関し、コンビナトリアル・ケミストリにおける多分子マーキングとして、数千、数万のオーダー以上の種々の微小物を高感度、高精度、安定的、且つ明瞭に峻別することを可能とするとともに、標的に対する捕獲能力の向上と、識別感度の向上と、識別数の増加との全てを同時に満足させることを目的とする。

【解決手段】 1個の微小粒子と、該微小粒子に一端が結合した多数の標的保有体と、各標的保有体の他端に結合した標識物質とからなり、該標的保有体は、1又は2以上の種類の標的を保有し又は保有可能であり、該標識物質は、所定の種類が所定の量比含まれるように構成する。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

【氏名又は名称】 工業技術院長

【特許出願人】

【識別番号】 591081697

【住所又は居所】 東京都稲城市矢野口1843番地1

【氏名又は名称】 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 598097677

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学工業技術研究所内

【氏名又は名称】 町田 雅之

【代理人】

【識別番号】 220000404

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-3

【氏名又は名称】 工業技術院生命工学工業技術研究所長

【代理人】

申請人

【識別番号】 100075199

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1の17の3 第12森ビル

【氏名又は名称】 土橋 皓

【代理人】

申請人

【識別番号】 100075199

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1の17の3 第12森ビル

【氏名又は名称】 土橋 皓

特平10-206057

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

氏 名 工業技術院長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591081697]

1. 変更年月日 1993年 7月13日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都稲城市矢野口1843番地1
氏 名 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598097677]

1. 変更年月日 1998年 7月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学工業
技術研究所内

氏 名 町田 雅之